

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(54)Title: NOVEL STAT FUNCTION-REGULATORY PROTEIN

(54)発明の名称 新規なSTAT機能抑制タンパク質

(57) Abstract

(57) Abstract
A protein regulating the functions of STAT proteins in the JAK/STAT signal transmission system in mammals characterized by being induced by STAT3 or STAT6, inhibiting the tyrosine phosphorylation of gp130 and STAT3 and having an SH2 region; a DNA encoding this protein; a method for screening substances having the function of regulating cytokines with the use of the above protein; the antisense DNA and RNA inhibiting the biosynthesis of the above protein; a monoclonal antibody capable of binding to the above protein; probe DNA and RNA hybridizable with the above DNA; a recombinant DNA constructed by integrating the above DNA into a vector allowing the replication thereof; the resultant transformant; and a method for screening substances having the function of regulating cytokines with the use of the above transformant.

ggccctccagtagtaggattggttagcagcgaacccaggtggagcgcgcgaacatcgcatctgca
H V A R N Q V A A D N A I S P A

cggcagcagagccgcgcgcgcgcgttagagcctctctctctctctctctctcgcctcgcgcag
A A E P R R R S S S S S S S S S S S P A

cggcccccctctcgtccccgcgcctcccgccgggggctccacagccacgcctctggcgacactc
A P V R P R P C P G G V F A F A F G D T H

acttcgcacactctcgcctcccaactccgattaacgcggcgagctcaacgcgcgcagcagcgcctc
F R T F R S H S D R R R X I T T A T S A L L

tggcgcctctcggctctctatttggggaccctcagdgctgcacggggcgacagcagcggctgc
D A C G F V N G P L L V V H Q A H E R L L R

gtgcgcagccctctgggcacaccttcttggtgcgcgcagctgcacacgggaactgctctcttc
A C P V Q T F L V V D S E Q R R C G C P F A

cgcctcagcgtgaagatggctctcgggcgcacacgagcactcgcctcgacattccagggcgcgc
L R V V K N A A C Q P T S I L R V N Q A Q R

gctctccacttgcgcgcgcgcgcgcacactctgcactgcctcttctcgagctctgggagcact
F H L L Q Q N R S T F D C L F E L L R H X

acgtgcgcgcgcgcgcgcgcctcttggggggccccgcctgcgcgcgcgcgcgcgtcggcgcc
V A A P R R H L G Q A P L R Q R V R P L

tgcagcagctctgctctgcacagcgcattctgggcgcgcctctggctgcgcagacacctgcgcga
Q E L C R Q R I V A A V C R E N L A R

tctctctaaccccggtactcctcgtgactacctgagttcctctccctctccagatctgcacgg
P L N P V L R D Y L S S F F P Q I S

ctgcgcgtctgcgcgcagcattagggggggcgcttatattctctattattattattattat
tctattctcttggaaccacgtctgggagccctccccgcctgggtctggaggagctggcttgga
gggtgagatgctctccactctctgctgggagacctcaccacactctcagagggtggggggtg
ctccccctctggtgctccccctccccctccccctgggtgtgacgagctctgctctggggcca
ggacctcgacatcccaactccacactcccatgtttacattctccagtatctcttgcacaaac
caggggtcggggagggtctctctggtcttattctctctgtctgcagaaatccctatttattat
tctttacggcaggttagttaataaactctattatgcgaagttttctctcttaagaacaaac
acaaagagct

(57) 要約

哺乳類の J A K / S T A T シグナル伝達系における S T A T タンパク質の機能を抑制するタンパク質であって、S T A T 3 又は S T A T 6 で誘導され、g p 1 3 0 及び S T A T 3 のチロシンリン酸化を阻害し、S H 2 領域を有することを特徴とするタンパク質及びこのタンパク質をコードする D N A が開示される。更に、本発明のタンパク質を用いたサイトカインレギュレーター作用を有する物質をスクリーニングするための方法が開示される。又、上記タンパク質の生合成を抑制するアンチセンス D N A 及び R N A ; 上記タンパク質に結合しうるモノクローナル抗体 ; 及び上記 D N A にハイブリダイズしうるプローブ D N A 及び R N A が開示される。更に、上記 D N A を複製可能なベクターに組み込んでなる組換え体 D N A ; その形質導入体 ; 及び形質導入体を用いたサイトカインレギュレーター作用を有する物質をスクリーニングするための方法が開示される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

[illegible]

新規な S T A T 機能抑制タンパク質

技術分野

本発明は、哺乳類の J A K / S T A T シグナル伝達系における S T A T タンパク質の機能を抑制するタンパク質及びそのタンパク質をコードする D N A に関する。このタンパク質は S T A T 3 又は S T A T 6 により誘導され、 g p 1 3 0 及び S T A T 3 のチロシンリン酸化を阻害し、 S H 2 領域を有することを特徴とする。本発明のタンパク質を用いることにより、新規なサイトカインレギュレーター作用を有する物質をスクリーニングすることができる。また、本発明は、上記タンパク質の生合成を抑制するアンチセンス D N A 及び R N A ; 上記タンパク質に結合しうるモノクローナル抗体 ; 上記 D N A にハイブリダイズしうるプローブ D N A 及び R N A ; 上記 D N A を複製可能なベクターに組み込んでなる組換え体 D N A ; 及びその形質導入体に関する。更に本発明の形質導入体も、新規なサイトカインレギュレーター作用を有する物質のスクリーニングに用いることができる。

従来技術

細胞間の情報伝達を担う蛋白性の化学物質は総称してサイトカインと呼ばれている。このようなサイトカインとしてイ

インターフェロン、インターロイキン、コロニー刺激因子等多くの物質が見出されている。サイトカインの特徴は糖蛋白であり、標的細胞の表面に特徴的な受容体が発現し、サイトカインの持つ細胞増殖、分化などの生理活性は、この受容体分子とサイトカインが結合することによって初めて発揮されるといわれている。

このような面からサイトカインの細胞内における情報伝達の仕組みを解明し、その制御機構をあきらかにすることは、新たな医薬の開発あるいは治療法の開発につながる可能性があり、きわめて重要な意義を有している。最近サイトカインの情報伝達機構も次第に明らかにされつつある。ほとんどのサイトカイン受容体 (Cytokine receptor) は、2 個又は 3 個のポリペプチド鎖、すなわち、リガンド特異的受容体鎖及び種々のサイトカインで共通に使用されるシグナル伝達体より構成されている [FASEB J. 6, 3387-3396(1992); Cell 69, 1121-1132(1992)]。これらの受容体系の性質は、サイトカインの機能的重複性を説明するものである。例えば、竹田氏ら (Molecular Medicine vol.33 臨時増刊号、免疫1996~97、ii) によると、サイトカイン受容体の細胞質内の部分には、チロシンのリン酸化活性を有する J A K キナーゼ (Janus kinase) が結合している。そして、リガンドであるサイトカインの結合によって受容体は複合体を形成し、それに伴って J A K キナーゼが接近し、J A K キナーゼが活性化される。そ

の結果、接近した2個のJAKキナーゼ自体及びサイトカイン受容体がリン酸化される。

このような状態になると細胞内のSTAT (Signal transducer and activator of transcription)タンパク質が受容体に結合し、細胞膜のサイトカインからの情報を細胞核内の遺伝子に伝達する。gp130は、IL-6 (interleukin-6)、IL-11 (interleukin-11)、LIF (leukemia inhibitory factor)などの受容体を構成するタンパク質であり、サイトカインが受容体に結合すると、JAKキナーゼが活性化され、gp130がリン酸化されることが知られている。STATはリン酸化されたgp130に結合し、その結果、シグナル伝達が起こる。

STATタンパク質は最近見出されたタンパク質で、現在STAT1からSTAT6まで6種類のタンパク質が知られている。STATタンパク質から細胞核内遺伝子への情報伝達は、前記のようなリガンド、即ちサイトカインの受容体への結合によってJAKキナーゼが活性化され、STATタンパク質のチロシン残基のリン酸化が起り、リン酸化されたSTATタンパク質は同一または異なった種類のSTATタンパク質とホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成し、サイトカインの情報を細胞核内の遺伝子に伝達するようになる。このようにしてSTATが活性化され、標的遺伝子まで移動すると遺伝子の特定の場所に結合し、RNAの合成が開始さ

れ、それに伴って新たなタンパク質が生合成される。

リガンドを結合した受容体成分のホモ又はヘテロ 2 量体(リガンド-受容体複合体、即ち、リガンドの結合した受容体によって形成された複合体)の形成は、サイトカインによって開始されるユニークなカスケード[Cell 80, 213-223(1995)]である JAK / STAT 経路の活性化[Science 264, 1415-1421(1994); Nature 377, 591-594(1995); Cell 84, 331-334(1996)]を誘導し、続いて標的遺伝子の活性化を誘導する。しかし、STATファミリーのタンパク質によって直接その発現が誘導されるターゲットについては、ほとんど知られていない。サイトカインの特徴のひとつは、その活性の一時的な短時間の発現であって、このことはサイトカインシグナル伝達にネガティブフィードバック制御 (negative feedback regulation) が存在することを示唆している。サイトカインシグナル伝達のネガティブフィードバック制御としては次の数例がいままでに知られているにすぎない：

(i) チロシンリン酸化 IL-3 受容体 β 鎖及びエリスロポエチン受容体 (EPO-R) と結合するチロシンホスファターゼ (SHP-1) [Cell 85, 15(1996); Mol. Cell. Biol. 13, 7577-7586(1993); Cell 80, 729-738(1995)] 及び

(ii) EPO-R の STAT 5 結合サイトに結合する CIS [EMBO J. 14, 2816-2826(1995); 同誌 15, 2425-2433(1996)]。

このように S T A T の標的遺伝子及びサイトカインのシグナルをネガティブに制御するフィードバック機構にはいまだ不明な点が多い。

従って、本発明者らは、このように S T A T のシグナルを制御している新規な遺伝子のタンパク質を単離し、サイトカインシグナルをネガティブに制御する新規なフィードバック機構を解明しようと試みた。

即ち、本発明の課題は、S T A T のシグナルを制御している新規なタンパク質を見出し、これを医療の分野で利用する方法を提供することにある。さらに本発明の課題は、S T A T の標的遺伝子の発現、即ち、S T A T により発現が誘導される遺伝子の発現により生合成され、S T A T 機能を抑制するタンパク質を提供し、これを医療の分野で利用する方法を提供することにある。

発明の概要

本発明者らは、このような課題を解決するために、S T A T のシグナルを規制している遺伝子の単離及びその機能解析を試みた。すなわち、従来知られている、S T A T 1 ～ 6 間のシグナル伝達に重要な領域である S H 2 (src homology-2) 領域内で高度に保存されているアミノ酸配列 G T F L L R F S (三文字略記では Gly-Thr-Phe-Leu-Leu-Arg-Phe-Ser) (この部位は、S H 2 領域のリン酸化チロシン認識部位である) に対するモノクローナル抗体を作製し、マウス胸腺 (murine

(thymus) c D N A ライブラリーのクローニングによって得られた 3 0 0 万プラークのファージ遺伝子をスクリーニングしたところ、従来知られている S T A T 3 等の遺伝子を除いて約 2 0 種の未知の遺伝子を得た。

このうち 5 種の遺伝子の全長塩基配列を決定したところ、2 種の S H 2 領域を有する遺伝子を得た。このうち 1 種の遺伝子の発現するタンパク質は、後に公知の C I S タンパク質 (Cytokine inducible SH2-containing protein: サイトカインによって誘導される SH2 含有タンパク質) であることが判明した。他の 1 種の遺伝子が発現するタンパク質は、2 1 2 個のアミノ酸よりなり、C 末側に S H 2 領域、N 末側にセリンが 8 個並ぶ領域を持ったタンパク質だった。その後の研究から、このタンパク質は通常、g p 1 3 0 を介する刺激により誘導されるが、特にチロシンリン酸化を受けないドミナントネガティブ型 S T A T 3 (アミノ酸配列において 7 0 5 番のチロシンをフェニールアラニンに置換した S T A T 3 遺伝子) を形質導入した細胞においては、上記の新規遺伝子の発現は誘導されないことがノーザンブロッティング (northern blotting) で確認された。そして、この遺伝子に基づくアミノ酸配列を解析したところ、配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有することが判明した。本発明者らは、この遺伝子のコードするタンパク質を S I I S - 1 ("structure and function of a novel STATs-induced inhibitor of STA

Ts function-1” の略) と命名した。更に、因子依存性の細胞系を用いた解析から S I I S - 1 は S T A T 6 でも誘導されることが明らかとなり、抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体によるイムノブロットを行った結果、g p 1 3 0 及び S T A T 3 のチロシンリン酸化を阻害する性質を有することが判明した。

即ち、本発明の主な目的は、以下のタンパク質を提供することにある。哺乳類の J A K / S T A T シグナル伝達等における S T A T タンパク質の機能を抑制するタンパク質であって、実質的に純粋であり、且つ次の特徴を有するタンパク質。

(1) S T A T 3 又は S T A T 6 によって誘導される。

(2) g p 1 3 0 及び S T A T 3 のチロシンリン酸化を阻害する。

(3) S H 2 領域を有する。

また、本発明は、このアミノ酸配列をコードする D N A、特に配列表配列番号 1 で示される塩基配列をもつ D N A を提供することにある。

又、本発明の他の 1 つの目的は、これらのタンパク質にサンプル物質を添加し、S I I S - 1 タンパク質の活成化又は活成阻害作用によって或る物質の医薬あるいは診断薬としての有用性をスクリーニングする方法を提供することにある。

本発明の更に他の 1 つの目的は、これらのタンパク質の発

現を抑制するアンチセンスDNA及びRNA、タンパク質に対するモノクローナル抗体、あるいは上記のDNAにハイブリダイズしうるDNA及びRNAプローブを提供することにある。

本発明の更に他の1つの目的は、S I I S - 1をコードする遺伝子を組み込んだ組み換え体DNA及びそのDNAによる形質導入体を提供することにある。

本発明の更に他の1つの目的は、形質導入体を用いたスクリーニング方法を提供することにある。

本発明の上記及び他の諸目的、諸特徴並びに諸利益は、添付の配列表及び図面を参照しながら述べる次の詳細な説明及び請求の範囲の記載から明らかになる。

配列表の簡単な説明

配列番号1は、本願発明である新規なSTAT機能抑制タンパク質のアミノ酸配列及びDNA塩基配列である。

図面の簡単な説明

図面において：

図1は、S I I S - 1 cDNAのヌクレオチド及びそれから推定されるアミノ酸配列であり、図中、*は停止コドン、アンダーラインはSH2領域のアミノ酸配列を示し；

図2は、S I I S - 1, C I S, S T A T 3及びS T A T

6 の S H 2 領域の配列を示し、図中、* は C I S と S I I S - 1 で同一のアミノ酸配列、アンダーラインはリン酸化チロシン認識部位を示し；

図 3 は、マウスの種々の組織における S I I S - 1 m R N A の発現の状態を示し、図中、H は心臓、B は脳、S は脾臓、L u は肺、L は肝臓、S m は骨格筋、K は腎臓、T e は精巢を示し；

図 4 は、因子依存性細胞における S I I S - 1 m R N A の誘導の状態を示し；

図 5 は、野生型 S T A T 3 又はドミナントネガティブ型 S T A T 3 を形質導入した M 1 細胞中における S I I S - 1 m R N A の発現の状態を示し；

図 6 は、野生型及び変異型 S I I S - 1 遺伝子で形質導入した M 1 形質導入株の L I F による誘導後の生存率を示し；

図 7 は、野生型及び変異型 S I I S - 1 遺伝子で形質導入した M 1 形質導入株の L I F による誘導後 1 日目の [³H] チミジン取り込み量を示し；

図 8 (a) は、母 M 1 細胞の L I F による誘導後 3 日のメイノーグリンワルドーギムサ染色結果を示し；

図 8 (b) は、M 1 - N E O 細胞の L I F による誘導後 3 日のメイノーグリンワルドーギムサ染色結果を示し；

図 8 (c) は、変異型 S I I S - 1 (S H -) 遺伝子で形質導入した M 1 形質導入株の L I F による誘導後 3 日のメイ

シーグルンワルドーギムサ染色結果を示し；

図8（d）は、野生型S I I S - 1（S H +）遺伝子で形質導入したM1形質導入株のL I Fによる誘導後3日のメイシーグルンワルドーギムサ染色結果を示し；

図9は、野生型及び変異型S I I S - 1遺伝子で形質導入したM1形質導入株のg p 1 3 0及びS T A T 3のI L - 6誘導によって起るチロシンリン酸化の状態を示す。

発明の詳細な説明

本発明によれば、新規な S T A T タンパク質の機能を抑制するタンパク質及びそのアミノ酸をコードする遺伝子 D N A が提供される。

次に、本発明の理解を容易にするために、本発明の基本的特徴及び好ましい態様を列挙する。

1. 哺乳類の J A K / S T A T シグナル伝達系における S T A T タンパク質の機能を抑制するタンパク質であって、実質的に純粋であり且つ次の特徴を有するタンパク質。

(1) S T A T 3 又は S T A T 6 により誘導される。

(2) g p 1 3 0 及び S T A T 3 のチロシンリン酸化を阻害する。

(3) S H 2 領域を有する。

2. 該タンパク質が、配列番号 1 の 2 1 2 個のアミノ酸よりなるアミノ酸配列と少なくとも 4 0 % の相同性を有するアミノ酸配列の少なくとも 1 5 0 個の連続したアミノ酸からなる配列を包含することを特徴とする前項 1 に記載のタンパク質。

3. 該タンパク質が、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する前項 2 に記載のタンパク質。

4. 前項 1 ～ 3 のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA。

5. 該 DNA が配列番号 1 の塩基配列を有する前項 4 に記載の DNA。

6. サイトカインレギュレーター作用を有する物質をスクリーニングする方法にして、サンプル材料を前項 1 ～ 3 のいずれかに記載のタンパク質に接触させ、サンプル試料中に含まれる物質による該タンパク質の活性化又は活性阻害を指標として、サイトカインレギュレーター作用を有する物質を検出することを特徴とするスクリーニング方法。

7. 前項 1 ～ 3 のいずれかに記載のタンパク質の生合成を抑制するアンチセンス DNA。

8. 前項 1 ～ 3 のいずれかに記載のタンパク質の生合成を抑制するアンチセンス RNA。

9. 前項 1 ～ 3 のいずれかに記載のタンパク質に結合しうるモノクローナル抗体。

10. 前項 4 又は 5 に記載の DNA にハイブリダイズしうる

プローブDNA。

11. 前項4又は5に記載のDNAにハイブリダイズしうる
プローブRNA。

12. 前項4又は5に記載のDNAを複製可能なベクターに
組み込んでなる複製可能な組換え体DNA。

13. 前項12に記載の複製可能な組換え体DNAで形質導
入された微生物又は細胞。

14. サイトカインレギュレーター作用を有する物質をスク
リーニングする方法にして、サンプル材料を前項13に記載
の形質導入された微生物又は細胞に接触させ、サンプル試料
中に含まれる物質による、上記形質導入された微生物又は細
胞中の該組み換え体DNAがコードするタンパク質の活性化
又は活性阻害を指標として、サイトカインレギュレーター作
用を有する物質を検出することを特徴とするスクリーニング
方法。

以下、本発明について具体的に説明する。

尚、本発明において、DNA塩基配列中のAはアデニン、
Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを示す。

また、本発明において、アミノ酸配列中のAはアラニン、Rはアルギニン、Nはアスパラギン、Dはアスパラギン酸、Cはシステイン、Qはグルタミン、Eはグルタミン酸、Gはグリシン、Hはヒスチジン、Iはイソロイシン、Lはロイシン、Kはリジン、Mはメチオニン、Fはフェニルアラニン、Pはプロリン、Sはセリン、Tはスレオニン、Wはトリプトファン、Yはチロシン、Vはバリンである。

本発明者らは、SH2領域を含有し、STAT3によって誘導することができ、STAT3の機能を阻害するタンパク質をコードするcDNAをクローニングした。本発明者らは、STATファミリーの新規メンバーをクローニングする目的でSTAT3の有するリン酸化チロシン認識サイトであるSH2領域の一部アミノ酸配列であるGTFLLRF S [Science 267, 1347-1349(1995)] に対するモノクローナル抗体を調製した。そして、この抗体を用いてマウス胸腺cDNAライブラリーをスクリーニングし、20個の未知の遺伝子を単離した。このうち2個はSH2領域を含んでいた。このうちの1個は公知のCIS [EMBO J. 14, 2816-2826(1995)] と同定され、他の1個が新規な遺伝子であることが判明した。そして、本発明者らは、この遺伝子のコードするタンパク質をSIIS-1と命名した。

SIIS-1のcDNAは、212個のアミノ酸からなるポリペプチドをコードするシングルオープンリーディングフ

レームを持ち、その配列の中間(コドン79-167番)にSH2領域を含有している。S I I S - 1中には、SH3領域のような他のコンセンサスモチーフは見出されなかった(図1参照、図中、*は停止コドン、アンダーラインはSH2領域のアミノ酸配列を示す)。このS I I S - 1のSH2領域は、C I Sのそれとわずかな相同性(アミノ酸の相同性が36%)を示したが、SH2領域内のリン酸化チロシン認識部位[Cell 77, 63-71(1994); Science 264, 95-98(1994); Science 265, 1701-1706(1994)]を除くと、S T A T 3又はS T A T 6のアミノ酸配列との有意な相同性は見出されなかった(図2参照、図中、*はC I SとS I I S - 1で同一のアミノ酸配列、アンダーラインはリン酸化チロシン認識部位を示す)。

本発明者らはマウスの種々の組織におけるS I I S - 1遺伝子の発現を検討した。その結果、図3から明らかなように、S I I S - 1のmRNAは、偏在的に発現するが、肺、脾臓及び精巣で強く、他の組織で弱いことが判明した。

又、本発明者らは、いくつかの因子依存性の細胞系においてS I I S - 1の誘導の可能性について検討した。

ハイブリドーマMH60細胞(myeloma MH60 cell)及びミエロイドロイケミアM1細胞(murine myeloid leukemia M1 cells; 以下、屡々“M1”と略す)においては、いずれもIL-6と可溶性IL-6受容体(sIL-6R)で処理することによりS I I S - 1 mRNAが発現した(図4

参照)。又、I L - 4 依存性細胞 (C T 4 S 細胞) [J. Immunol, 142, 800-807(1989)] 及び G - C S F (granulocyte colony stimulating factor) 依存性細胞 (N F S 6 0 細胞) は、それぞれ I L - 4 又は G - C S F に応答して S I I S - 1 mRNA を発現した。この結果から、S I I S - 1 は、S T A T 3 を活性化する I L - 6 及び G - C S F [Blood 84, 1760-1764(1994)] のみによって誘導されるばかりではなく、S T A T 6 を活性化するサイトカインの I L - 4 [Science 265, 1701-1706(1994)] によっても誘導されることが判明した。これらの知見と一致して、S I I S - 1 遺伝子のプロモーター領域は、S T A T 3 及び S T A T 6 結合部位 [Cell 77, 63-71(1994), EMBO J. 14, 2527-2535(1995)] を含んでいることが本発明者らによって見出されている。

更に、本発明者らは、野生型 S T A T 3 を形質導入した M 1 細胞 (以下、屢々、「M 1 - S T A T 3」と略す) 及び Y 7 0 5 F [J A K キナーゼによってリン酸化されるチロシン残基 (7 0 5 番) がフェニルアラニンで置換された S T A T 3 のドミナントネガティブ (dominant negative) 型の遺伝子 (即ち、野生型に対して優性を示す変異)] を形質導入した M 1 細胞 (以下、屢々、「M 1 - Y 7 0 5 F」と略す) における S I I S - 1 の誘導について検討した。

この試験において、ネオマイシン耐性遺伝子のみを含む誘導 M 1 細胞 (以下、屢々、「M 1 - N e o」と略す) が対照

として用いられた。S I I S - 1 m R N A は対照の M 1 - N e o 細胞よりも M 1 - S T A T 3 細胞で L I F によってより強く誘導されたが、M 1 - Y 7 0 5 F 細胞では S I I S - 1 の誘導は観察されなかった（図 5 を参照）。この結果は、S I I S - 1 の遺伝子は、S T A T 3 の標的遺伝子のひとつであり、J A K / S T A T 経路によって誘導されることを示している。

次に、本発明者らは、g p 1 3 0 によって伝達されるシグナルの経路に及ぼす S I I S - 1 の影響を検討した。野生型 S I I S - 1 (S H +) , 又は S H 2 領域及び C - 末端領域を欠く変異型 S I I S - 1 (S H -) を常に発現する M 1 形質導入株（クローン）を確立した。図 6 に示すように、M 1 - N e o 及び変異型 S I I S - 1 (S H -) クローンは、母細胞の M 1 細胞で実証されているように、L I F 処理によって成長の停止及び細胞死に至り、クロマチンの凝縮及び a p o p t o t i c b o d i e s の発現のようなアポトーシスの特徴を示した（図 8 (a) ~ (c) 参照）。反対に、野生型 S I I S - 1 (S H +) クローンは、L I F で刺激しても成長の停止を示さなかった（図 6 、 7 、 8 (d) 参照）。これらの結果は、S I I S - 1 が g p 1 3 0 で伝達されるシグナルの経路をブロックすること、及び S I I S - 1 の S H 2 領域がこのブロック遮断に必須であることを示すものであった。

更に、本発明者らは、S I I S - 1 が、g p 1 3 0 で伝達

されるシグナルの経路を阻害するメカニズムについて検討した。即ち、IL-6とsIL-6Rで各細胞を刺激後[Science 267, 1349-1353(1995); Blood 86, 1243-1254(1995)], M1細胞のgp130及びSTAT3のチロシンリン酸化を調べた。図9に示すようにgp130及びSTAT3のチロシンリン酸化は、コントロールのM1-Neo細胞及び変異型SIIIS-1(SH-)クローンと比較して野生型SIIIS-1(SH+)クローンでは激減した。

上記実験結果から、本発明において、本発明者らが単離精製及びクローニングに成功したタンパク質は、STAT3又はSTAT6で誘導され、gp130及びSTAT3のチロシンリン酸化を阻害するSH2領域含有タンパク質SIIIS-1であることが明らかとなった。

STATシグナル経路のネガティブフィードバック制御に関与していることが知られているCIS[EMBO J. 14, 2816-2826(1995)、同誌15, 2425-2433(1996)]は、EPO受容体のSTAT5結合領域と直接結合してSTAT5機能を阻害する。しかし、JAK/STAT経路におけるSIIIS-1による阻害メカニズムは、CISと全く相違する。SIIIS-1は、STAT3及びシグナルを伝達する受容体成分のgp130のチロシンリン酸化を減少させる。

gp130のチロシンリン酸化は、STAT3結合領域でのSIIIS-1との結合のために必要であると考えられるの

で、S I I S - 1 が、g p 1 3 0 との結合において S T A T 3 と拮抗すると考えることは不適切である。S I I S - 1 は、J A K / S T A T シグナル経路を C I S よりも早い段階、即ち、J A K キナーゼとの結合を経てブロックすると考えられる。

その他の興味ある点は、S I I S - 1 は、全ての S T A T によって誘導されるのではないということであり、J A K / S T A T 経路の一般的阻害剤とは区別される。

本発明の S I I S - 1 c D N A を調製する際に用いられる細胞は特に限定されないが、市販の動物細胞の c D N A ライブラリーを用いることが好ましい。又、D N A の精製方法としては、S H 2 領域における保存性の高いアミノ酸配列 (G T F L L R F S) に対するモノクローナル抗体を従来の方法で作成し、市販の免疫スクリーニングキットに準じて行なうのが好ましい。

本発明のタンパク質は、実質的に純粋であり、且つ上記の S I I S - 1 としての機能を有するタンパク質であれば特に限定されず、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のみならず、配列番号 1 のアミノ酸配列の部分配列又は配列番号 1 のアミノ酸配列と相同性を有するアミノ酸配列を含有する配列である。本発明における部分配列とは連続した少なくとも 1 5 0 個のアミノ酸からなるものであり、S H 2 領域を含むことが必須である。更にこの配列は配列番号 1 のアミノ酸配列と少

なくとも40%の相同性を有するものである。本発明における相同性とは、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも40%の相同性を有し、且つ、S I I S - 1と同様に哺乳類のJ A K / S T A T シグナル伝達系におけるS T A T 機能を抑制する活性を有するものである。このような相同性を有する配列は、アミノ酸の置換、削除又は挿入によって得られ、上記の変化は、自然又は人為的な突然変異によって生じることがある。

本発明のタンパク質の特徴の1つは、S T A T 3 又はS T A T 6 で誘導されることである。この特徴は得られたタンパク質からも確認することが可能である。或るタンパク質のアミノ酸配列が既知なら、その遺伝子配列はデータベースから検索できる。アミノ酸配列が未知ならば、タンパク質からアミノ酸配列を決定し、その配列情報から遺伝子をクローニングしてタンパク質のm R N A を特異的に検出するプローブをデザインすることは可能である。或るタンパク質のm R N A がS T A T 3 またはS T A T 6 で誘導されたかどうかは、例えば実施例4のようなノーザンブロッティングによって確認することができる。S T A T 3 を形質導入したM1細胞でそのm R N A が誘導され、S T A T 3 のドミナントネガティブを形質導入したM1細胞で誘導されなければ、そのタンパク質はS T A T 3 で誘導されたものと結論することができる。

本発明のD N A は、上記のS I I S - 1 としての機能を有

するタンパク質をコードする塩基配列であれば特に限定されず、配列番号1に記載の塩基配列のみならず、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも40%の相同性を有する配列番号1のアミノ酸配列の部分配列を包含する配列をコードする塩基配列をも含むものである。S I I S - 1としての機能を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列であれば、配列番号1の塩基配列の部分配列及び部分配列を含有する塩基配列も本願発明に含まれる。

本発明は、前述したS I I S - 1タンパク質を用いた、新規なサイトカインレギュレーター作用を有する物質のスクリーニング方法である。このスクリーニング方法によれば、新規なサイトカインレギュレーター作用、即ち、S I I S - 1作用の阻害もしくはS I I S - 1様作用又はS I I S - 1活性作用を有する新薬のスクリーニングが可能となると考えられる。

本発明のタンパク質を用いたサイトカインレギュレーター作用を有する物質のスクリーニング方法としては、特に限定されないが、例えば、タンパク質を用いて測定のための系を構築し、スクリーニングを行うことができる。具体的には、S I I S - 1によって活成が阻害される物質等をスクリーニングすることが可能である。

S I I S - 1阻害作用、もしくはS I I S - 1様作用又はS I I S - 1活性化作用を有する物質のスクリーニングに使

うことができるサンプル物質は、細胞毒性を持つ物質以外であれば特に限定されない。例えば、高分子であっても、経口投与可能な低分子化合物であってもスクリーニングに用いることができる。例えば、スクリーニングによって得られた低分子の経口投与可能な化合物は、S I I S - 1 作用阻害剤もしくはS I I S - 1 様作用又はS I I S - 1 活性化作用を有する新規薬剤として用いることができる。

また、本発明はS T A T 機能抑制タンパク質の発現を抑制するアンチセンスDNA及びRNAである。本発明のS I I S - 1 をコードする遺伝子のアンチセンスDNA又はRNAは、G - C S F（先天性・特発性好中球減少症や骨髄移植時やガン化学療法による好中球減少症の治療に用いられる）やI L - 6（血小板減少症やガン化学療法による血小板減少症の治療薬として開発中）と同様に、内因性あるいは投与サイトカインの作用増強薬として使用可能である。

本発明のS I I S - 1 をコードするDNAの塩基配列をもとに、S I I S - 1 に特異的なアンチセンスDNA又はRNAを設計することは容易であり、更に、野生型S I I S - 1（S H +）を利用すれば、そのアンチセンスの効果を確認することが可能である。具体的には、L I F 存在下で培養した野生型S I I S - 1（S H +）にアンチセンスを作用させた場合、細胞の増殖阻害、DNA合成阻害、アポトーシスが見られ、且つ、抗S I I S - 1 抗体を用いた通常のウェスタン

23

プロット法などでS I I S - 1タンパク質の発現阻害が観察されれば、アンチセンスの有効性を証明することができる。

更に、本発明はS T A T機能抑制タンパク質に対するモノクローナル抗体である。本発明のモノクローナル抗体は診断目的に使用することができる。

本発明のモノクローナル抗体を取得する方法は特に限定されないが、単離されたS I I S - 1タンパク質を用いて、従来から用いられているモノクローナル抗体の製造方法、例えば細胞融合法に基づき取得することができる。抗体の製造に用いられるアミノ酸配列は特に限定されないが、6アミノ酸残基以上のものが用いられる。このような抗体を用いれば、細胞や組織中のS I I S - 1タンパク質を検出するE L I S AやR I A、またはウェスタンブロット系を構築することができる。このような検出系は、診断目的に使用することができる。

本発明はS I I S - 1 mRNA特異的なプローブDNA及びRNAに関する。S I I S - 1 mRNA特異的なプローブを用いて細胞や組織のS I I S - 1発現を検出することが可能なので、本発明のプローブを用いて診断的アッセイを行なうことができる。プローブとして用いられるDNAは本発明のS I I S - 1の塩基配列をもとに、周知の塩基対の法則（AとTが対になり、CとGが対になる）によって設計することが容易であり、従って、本発明のプローブは本発明の

DNAにハイブリダイズすることが可能な塩基配列であれば特に限定されない。具体的には配列番号1に開示されたS I I S - 1をコードする全長cDNA又はその部分配列を用いることができる。プローブを用いた診断的アッセイの方法としては、実施例に記載されているようなハイブリダイゼーション法、例えば、ノーザンハイブリダイゼーションなどの方法が用いられる。

本発明における組換え体DNAを調製するために用いられる発現ベクターは特に限定されないが、通常用いられる発現ベクターを利用することができる。本発明の組換え体DNAの具体的な例としてpEF-BOS/S I I S - 1 (SH+)が挙げられる。pEF-BOS/S I I S - 1 (SH+)は、発現ベクターpEF-BOSのクローニング部位にS I I S - 1遺伝子を挿入したものである。pEF-BOS/S I I S - 1 (SH+)は本発明のS I I S - 1遺伝子を原料に、実施例1に示した方法により構築することができる。具体的には、S I I S - 1 cDNAを制限酵素X b a lとP v u I Iで消化後、ブラントエンド化し、ベクターpEF-BOSのブラントエンド化したX b a lサイトに挿入することにより構築することができる。又、本発明の組換え体DNAは公知の宿主に導入することが好ましい。

本発明に用いられる宿主細胞としての微生物又は細胞は特に限定されないが、本発明の組換え体DNAが発現し、S I

IS-1の生合成が可能な宿主細胞が用いられる。例えば、上記したpEF-BOS/SIIS-1(SH+)をM1細胞にエレクトロポレーション法で形質導入することができる。本発明の形質導入された細胞は、上記の新規なサイトカインレギュレーター作用を有する物質のスクリーニングに用いることができる。又、形質導入した本発明の組換え体DNAを細胞によって発現させ、生合成されたタンパク質を抽出し、上記の新規なサイトカインレギュレーター作用を有する物質のスクリーニング又は本発明のタンパク質に結合しうるモノクローナル抗体を製造する際に用いることが可能である。

本発明は、SIIS-1をコードするDNAにより形質導入された微生物又は細胞を用いた、新規なサイトカインレギュレーター作用を有する物質のスクリーニング方法である。このスクリーニング方法によっても、上記のタンパク質を用いたスクリーニング方法と同様に新規なサイトカインレギュレーター作用、即ち、SIIS-1作用の阻害もしくはSIIS-1様作用又はSIIS-1活性作用を有する新薬のスクリーニングが可能となると考えられる。

本発明の形質導入体を用いたサイトカインレギュレーター作用を有する物質のスクリーニング方法としては、特に限定されないが、例えば、SIIS-1を形質導入した培養細胞に種々の物質を添加し、細胞死などの変化を観察することによりサイトカインレギュレーター作用を有する物質をスクリ

ーニングする方法が挙げられる。具体的には、野生型 S I I S - 1 (S H +) クローンを L I F 存在下で培養し、種々の物質を投与した時、細胞の死滅が観察され、染色後の細胞の顕微鏡下の観察によりクロマチンの凝縮等のアポトーシスが見られた場合は、S I I S - 1 作用を阻害する化合物の発見を意味する。又、L I F 存在下で培養している M 1 細胞又は M 1 - N e o 細胞の細胞死滅を延期または阻害する物質は、S I I S - 1 様作用又は S I I S - 1 活性化作用を有する物質と考えられるので、上記の培養細胞も新薬のスクリーニングに使用することができる。更に、S I I S - 1 を形質導入した培養細胞を種々の物質の存在下で培養し、その後、抗 g p 1 3 0 又は抗 S T A T 3 抗体を用いたウエスタンブロット法によりサイトカインレギュレーター作用を有する物質をスクリーニングする方法も挙げられる。具体的には、I L - 6 などで刺激後、S I I S - 1 をクローニングした培養細胞を種々の物質の存在下で培養し、その細胞の抽出物を抗 g p 1 3 0 又は抗 S T A T 3 抗体と反応させて免疫沈降物を得、その後、抗リン酸チロシンモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なう。g p 1 3 0 及び S T A T 3 のチロシンリン酸化の促進は S I I S - 1 の阻害を意味し、このような作用を有する物質のスクリーニングに使用することができる。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明は、これらの実施例によって何ら限定されるものではない。

参考例 1 細胞培養

細胞培養は、以下の方法及びこの方法に準じて行なわれた。

ミエロイドロイケミア M1 細胞 (Myeloid leukemia M1 cells) はイーグル最小基本培地 (Eagle's minimal essential medium) に、通常用いられる濃度の 2 倍のアミノ酸及びビタミンならびに 10% (v/v) 子牛血清 (FCS) を補給した培地で培養した。

IL-6 依存性ミエローマ MH60 細胞は IL-6 (5 ng/ml) と 10% FCS を補給した RPMI 1640 培地で維持した。

IL-2/IL-4 依存性 CT4S 細胞は IL-4 (10 U/ml) と 10% FCS を補給した RPMI 1640 培地で培養した。

IL-3 依存性ミエロイド NFS60 細胞は 10% FCS と IL-3 源として WEHI-3B (マウスの myelomonocyte) を培養した 10% コンディショニング培地を補給した RPMI 1640 培地で維持した。

STAT3 のドミナントネガティブ型を常に発現する M1

セルライン [M1-Y705F; Proc. Natl. Acad. Sci. U
SA 93, 3963-3966(1996)]は、 $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ Geneticin
(米国、GIBCO BRL 社製)の存在下で通常のM1細胞と同様に
培養した。

実施例 1

本発明の新規タンパク質 S I I S - 1 の調製方法

(1) S T A T の S H 2 領域に対するモノクローナル抗体の
精製

S T A T の S H 2 領域に存在する S T A T ファミリーメン
バー間で高度に保存されているアミノ酸配列 G T F L L R F
S (3文字略記ではGly-Thr-Phe-Leu-Leu-Arg-Phe-Ser)に
対するモノクローナル抗体を合成した。即ち、S T A T 3 の
S H 2 領域のアミノ酸600番から617番に相当する合成
オリゴペプチド T K P P G T F L L R F S E S S K E G (3
文字略記ではThr-Lys-Pro-Pro-Gly-Thr-Phe-Leu-Leu-Arg-P
he-Ser-Glu-Ser-Ser-Lys-Glu-Gly) をキーホールリムペット
ヘモシアニンに結合し、B A L B / c マウスに免疫した。こ
のマウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞P3-X63-Ag8-653
を融合して合成オリゴペプチド G T F L L R F S (F m o c
でN末端を保護したもの)に反応性のモノクローナル抗体を
生産するハイブリドーマ F L - 2 3 8 を確立した。ハイブリ
ドーマを用い、モノクローナル抗体を B A L B / c マウスの

腹水からプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。

(2) S I I S - 1 c D N A の単離

上記(1)で精製したG T F L L R F S のモチーフに対するモノクローナル抗体を用い、S T A T のS H 2 領域を有するc D N A をPicoBlue免疫スクリーニングキット(米国、Stratagene Cloning Systems 社製)を用いてマウス胸腺c D N A ライブラリー(LambdaZAP, 米国、Stratagene Cloning Systems 社製)から単離した。具体的には、マウス胸腺c D N A ライブラリーである300万プラークのファージ遺伝子を免疫スクリーニングキットの方法に従ってスクリーニングし、従来より知られているS T A T 3 等の遺伝子を除いて約20種の未知の遺伝子を得た。

このうち、5種の遺伝子の全長塩基配列の決定を行なった。このうち、2種の遺伝子がS H 2 領域を有していた。この1種は公知のC I S タンパク質をコードする遺伝子であり、他の1種は212個のアミノ酸からなり、3'側にS H 2 領域、5'側のセリンが8個並んだ領域をもった新規タンパク質をコードする遺伝子であった。そして、これをS I I S - 1 (Structure and function of a novel STATs-induced inhibitor of STAT function-1 の略)と命名した。

(3) S I I S - 1 発現プラスミドの構築

上記(2)で単離したS I I S - 1 c D N A を制限酵素

X b a l と P v u I I で消化し、得られた制限酵素断片をブラントエンド化し、哺乳動物発現ベクター p E F - B O S のブラントエンド化した X b a l サイトに挿入した。以下、構築した S I I S - 1 発現ベクターを p E F - B O S / S I I S - 1 (S H +) とする。

S H 2 領域を欠損した変異型 S I I S - 1 を構築するために、p E F - B O S / S I I S - 1 (S H +) を制限酵素 B s s H I I で消化し、生じた 3 6 0 b p の断片を除去した。得られた S H 2 領域及び C 末端の領域を欠損した S I I S - 1 発現ベクター（即ち、S I I S - 1 変異ベクター）を、p E F - B O S / S I I S - 1 (S H -) とした。

上記で構築した p E F - B O S / S I I S - 1 (S H +) 又は p E F - B O S / S I I S - 1 (S H -) のいずれか一方の発現ベクターとネオマイシン耐性遺伝子をコードする p S V 2 N e o とを 2 0 : 1 の比率で混ぜ、M 1 細胞にエレクトロポレーション法で形質導入した。ネオマイシン耐性を指標とし、形質導入体（クローン）を Geneticin（米国、GIBCO BRL 社製）7 5 0 μ g / m l を含む成長培地中で選択した。

実施例 2

マウスの種々の組織における S I I S - 1 の発現

放射線標識した全長 S I I S - 1 c D N A をプローブとして用い、マウス N T N ブロット膜（米国、Clontec 社製）とハ

イブリダイゼーションを行った。尚、対照として市販の β -アクチンのプローブを用いた。結果を図3に示す。図中、Hは心臓、Bは脳、Sは脾臓、Luは肺、Lは肝臓、Smは骨格筋、Kは腎臓、Teは精巢を示す。

その結果、S I I S - 1 の m R N A は、偏在的に発現するが、肺、脾臓及び精巢で強く、他の組織で弱いことが判明した。

実施例 3

因子依存性の細胞系における S I I S - 1 の誘導の可能性の検討

MH60細胞とM1細胞はそれぞれIL-6 (50 ng/ml) 及びsIL-6R (5 ng/ml) で刺激された。IL-4依存性のCT4S細胞はIL-4 (10 U/ml) 及びIL-2 (10 ng/ml)、G-CSF依存性のNFS60細胞はG-CSF (20 ng/ml) 及びIL-3 (5 ng/ml) でそれぞれ刺激された。

M1細胞を除くその他の細胞は、1% BSAを含むRPMI培地で4時間培養して培地中の因子を除去し、その後、各サイトカインを加えた培地で図に示された時間(分)培養することにより刺激した。M1細胞は参考例1に記載の方法で培養後、サイトカインを加えた培地で図に示された時間(分)培養することにより刺激した。

32

サイトカインにより刺激された細胞から、I s o - G e n (日本国、Nippon Gene社製) を用いて細胞質RNAを抽出した。得られた全RNA (5 μ g / m l) をアガロースゲル電気泳動し、ナイロン膜 (Hybond+, 英国、Amerasham社製) に移した。この膜を放射性標識したS I I S - 1プローブ並びに市販の β -アクチンプローブ及びc - m y cプローブを用いてそれぞれハイブリダイゼーションを行なった。その結果を図4に示した。

図4に示すように、MH60細胞及びM1細胞はいずれも、60～120分間のIL-6及びsIL-6Rによる処理後S I I S - 1のmRNAの発現がピークに達した。CT4S細胞及びNFS60細胞は、それぞれIL-4及びG-CSFに応答してS I I S - 1のmRNAを発現した。この結果から、S I I S - 1は、STAT3を活性化するIL-6及びG-CSFのみによって誘導されるばかりではなく、STAT6を活性化するサイトカインのIL-4によっても誘導されることが判明した。

実施例4

野生型STAT3又はY705FでトランスフェクトしたM1細胞中でのS I I S - 1の誘導についての検討

野生型STAT3遺伝子をトランスフェクトしたM1細胞 (以下、屢々、M1-STAT3と呼ぶ)、及びSTAT

3の705番目のTyr (Y) (JAKキナーゼによってリン酸化されるチロシン残基) がポイントミューテーションによってPhe (F) に置換されたドミナントネガティブ型遺伝子をトランスフェクトしたM1細胞 (以下、屢々、M1-Y705Fと呼ぶ) を用いた。対照としてネオマイシン耐性遺伝子のみをトランスフェクトしたM1細胞 (以下、屢々、M1-Neoと呼ぶ) を用いた。それぞれの細胞を、図5に示す種々の期間、実施例3と同様の方法で1000U/mlのLIFで刺激し、全RNAを抽出し、SIS-1及びβ-アクチンプローブでノーザンブロッティングを行なった。その結果を図5に示した。

SIS-1のmRNAは、対照のM1-Neo細胞よりもM1-STAT3細胞でLIFによってより強く誘導されたが、M1-Y705F細胞における誘導は観察されなかった。この結果から、SIS-1遺伝子は、STAT3の標的遺伝子のひとつであり、JAK/STAT経路によって誘導されることを示している。

実施例 5

gp130によって伝達されるシグナルの経路におけるSIS-1の影響についての検討

実施例1に記載した方法により得られた野生型SIS-1 (SH+) 発現M1形質導入株、変異型SIS-1 (S

H-) 発現 M1 形質導入株、母 M1 細胞及び M1 - Neo を用いて実験を行なった。

各細胞株を LIF (1000 U/ml) 含有培地に植え付け (0 日目)、1 日 ~ 4 日間培養した。細胞の生存率 (viability) を 0, 1, 3 及び 4 日目に「細胞免疫実験操作法」(p.15~16; Barbara B. Mishell et al. 編、理工学社刊、1982) 記載の方法に従って測定した結果を図 6 に示した。

各細胞の 1 日目の [³H] - チミジン取り込み量を「続生化学実験講座 5 免疫生化学法」(p.198; 日本生化学会編、東京化学同人、1986) に記載の方法に従って測定し、図 7 に示した。

又、上記の条件で 3 日間培養した各細胞のメイ - グルンワルド - ギムサ (May-Grunwald-Giemsa) 染色を行ない、光学顕微鏡を用いて観察した。その結果を図 8 に示した。

図 6, 7, 8 (a) ~ (d) において、M1 は母 M1 細胞、Neo は M1 - Neo、SH (-) は SH2 領域欠損変異型 S I I S - 1 発現 M1 細胞、SH (+) は野生型 S I I S - 1 発現 M1 細胞を示す。

図 6 に示すように、M1 - Neo 及び SH - は、母細胞の M1 細胞で実証されているように、LIF 処理後成長の停止及び細胞死を引き起こした。この死滅細胞は、クロマチンの凝縮及び apoptotic bodies の発現 (図 8 (a) (b) (c) 参照) のようなアポトーシスの特徴を示した。反対に、SH

＋は、L I Fで刺激しても成長の停止を示さなかった（図6、7及び8（d）参照）。これらの結果は、S I I S－1がg p 1 3 0で伝達されるシグナルの経路をブロックすること、及びS I I S－1のS H 2領域がこのブロック遮断に必須であることを示した。

実施例 6

S I I S－1によるg p 1 3 0で伝達されるシグナルの経路の阻害メカニズムについての検討

実施例1に記載した方法により得られた野生型S I I S－1（S H＋）発現M1形質導入株、変異型S I I S－1（S H－）発現M1形質導入株、母M1細胞及びM1－N e oを用いて実験を行なった。

各細胞（ 5×10^7 細胞）をI L－6（ $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）とs I L－6 R（ $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）で0から5分間処理し、その後、タンパク質分解酵素阻害剤を含む細胞溶解緩衝液（0.5% Nonidet P-40, 10 mM トリス、pH 7.4, 150 mM N a C l、1 mM E D T A、1 mM N a₂V O₄）に溶解した。各細胞溶解物を抗g p－1 3 0抗体（米国、Upstate Biotechnology社製）または抗S T A T 3抗体と反応させ、得られた免疫沈降物をS D S－P A G Eで分離した。分離した免疫沈降物を抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体（4G10, 米国、Upstate Biotechnology社製）で免疫ブ

ロットした。結合した抗体は chemiluminescence system (英国、Amersham社製) で視覚化して確認した。その結果を図9に示した。

図9において、aは抗gp130抗体で得た免疫沈降物、bは抗STAT3抗体で得た免疫沈澱物をそれぞれ抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体でイムノブロットした結果を示す。図9に示すようにgp130及びSTAT3のチロシンリン酸化は、コントロールのM1-Neo及びSH-にくらべてSH+では、激減した。

上記の実施例1～6により明らかとなった本発明のSII S-1の性質と公知のCISの性質の対比を表1に示した。

表 1

S I I S - 1 と C I S の 比 較

| | S I I S - 1 | C I S |
|---------------|---|--|
| 全長 (7ミノ酸数) | 212個 | 257個 |
| 発現を誘導するサイトカイン | IL-6, LIF, G-CSF, IL-4 | IL-2, IL-3, GM-CSF, EPO |
| 発現を誘導する STAT | STAT-3, STAT-6 | STAT-5 |
| 阻害される STAT | STAT-3 | STAT-5 |
| SH2領域の有無 | 有 (アミノ酸79番～167番 ; CISアミノ酸配列との 相同性 : 36%) | 有 |
| SH3領域の有無 | 無 | 無 |
| 作用メカニズム | 受容体、STATのチロシンリン酸化の阻害 ⇒STAT機能抑制 | チロシンリン酸化された受容体の STAT-5 結合部位にSH2領域を介して結合 ⇒STAT-5結合阻害 ⇒STAT-5機能抑制 |
| 活 性 | <ul style="list-style-type: none"> ・ LIF-mediated apoptosis の阻害 ・ LIF-mediated growth arrest の阻害 ・ M1細胞のマクロファージの分化抑制 | <ul style="list-style-type: none"> ・ IL-3, EPO-dependent cell proliferation の阻害 |
| 発現部位 | 強い : 肺、脾臓、精巣 弱い : その他の組織 | 強い : 腎臓、肺、肝臓 弱い : 胃、心臓 なし : 脳、脾臓 |

産業上の利用可能性

本発明のS I I S - 1タンパク質や形質導入体を用いると、新規なサイトカインレギュレーター作用を有する物質をスクリーニングにすることができる。また、本発明で開示されたS I I S - 1の塩基配列情報をもとに、S I I S - 1特異的なアンチセンスDNA及びRNAを設計することができる。サイトカインレギュレーター作用を有する物質やS I I S - 1のアンチセンスDNA及びRNAは、薬効を持つ内因性あるいは投与サイトカインの作用増強薬として使用可能である。

本発明のS I I S - 1特異的なモノクローナル抗体を用いれば、細胞や組織中のS I I S - 1蛋白を検出するELISAやRIA、またはウェスタンブロット系を構築することができる。また、S I I S - 1 mRNAに特異的なプローブDNAおよびRNAを用いて細胞や組織のS I I S - 1発現を検出することが可能である。このような検出系は、診断目的に使用され得る。

3 9

配列表

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 1 0 8 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

起源 : マウス胸腺

配列 :

| | |
|---|-----|
| GGCCCCCTCGA GTAGG ATG GTA GCA CGC AAC CAG GTG GCA GCC GAC AAT GCG | 51 |
| Met Val Ala Arg Asn Gln Val Ala Ala Asp Asn Ala | |
| 1 5 10 | |
| ATC TCC CCG GCA GCA GAG CCC CGA CGG CGG TCA GAG CCC TCC TCG TCC | 99 |
| Ile Ser Pro Ala Ala Glu Pro Arg Arg Arg Ser Glu Pro Ser Ser Ser | |
| 15 20 25 | |
| TCG TCT TCG TCC TCG CCA GCG GCC CCC GTG CGT CCC CGG CCC TGC CCG | 147 |
| Ser Ser Ser Ser Ser Pro Ala Ala Pro Val Arg Pro Arg Pro Cys Pro | |
| 30 35 40 | |
| GGG GTC CCA GCC CCA GCC CCT GGC GAC ACT CAC TTC CGC ACC TTC CGC | 195 |
| Gly Val Pro Ala Pro Ala Pro Gly Asp Thr His Phe Arg Thr Phe Arg | |
| 45 50 55 60 | |
| TCC CAC TCC GAT TAC CGG CGC ATC ACG CGG ACC AGC GCG CTC CTG GAC | 243 |
| Ser His Ser Asp Tyr Arg Arg Ile Thr Arg Thr Ser Ala Leu Leu Asp | |
| 65 70 75 | |

4 O

GCC TGC GGC TTC TAT TGG GGA CCC CTG AGC GTG CAC GGG GCG CAC GAG 291

Ala Cys Gly Phe Tyr Trp Gly Pro Leu Ser Val His Gly Ala His Glu

80

85

90

CGG CTG CGT GCC GAG CCC GTG GGC ACC TTC TTG GTG CGC GAC AGT CGC 339

Arg Leu Arg Ala Glu Pro Val Gly Thr Phe Leu Val Arg Asp Ser Arg

95

100

105

CAA CGG AAC TGC TTC TTC GCG CTC AGC GTG AAG ATG GCT TCG GGC CCC 387

Gln Arg Asn Cys Phe Phe Ala Leu Ser Val Lys Met Ala Ser Gly Pro

110

115

120

ACG AGC ATC CGC GTG CAC TTC CAG GCC GGC CGC TTC CAC TTG GAC GGC 435

Thr Ser Ile Arg Val His Phe Gln Ala Gly Arg Phe His Leu Asp Gly

125

130

135

140

AAC CGC GAG ACC TTC GAC TGC CTT TTC GAG CTG CTG GAG CAC TAC GTG 483

Asn Arg Glu Thr Phe Asp Cys Leu Phe Glu Leu Leu Glu His Tyr Val

145

150

155

GCG GCG CCG CGC CGC ATG TTG GGG GCC CCG CTG CGC CAG CGC CGC GTG 531

Ala Ala Pro Arg Arg Met Leu Gly Ala Pro Leu Arg Gln Arg Arg Val

160

165

170

CGG CCG CTG CAG GAG CTG TGT CGC CAG CGC ATC GTG GCC GCC GTG GGT 579

Arg Pro Leu Gln Glu Leu Cys Arg Gln Arg Ile Val Ala Ala Val Gly

175

180

185

CGC GAG AAC CTG GCG CGC ATC CCT CTT AAC CCG GTA CTC CGT GAC TAC 627

Arg Glu Asn Leu Ala Arg Ile Pro Leu Asn Pro Val Leu Arg Asp Tyr

190

195

200

CTG AGT TCC TTC CCC TTC CAG ATC TGACCGGCTG CCGCTGTGCC GCAGCATTAA 681

Leu Ser Ser Phe Pro Phe Gln Ile

205

210

GTGGGGGCGC CTTATTATTT CTTATTATTA ATTATTATTA TTTTCTGGA ACCACGTGGG 741

AGCCCTCCCC GCCTGGGTGG GAGGGAGTGG TTGTGGAGGG TGAGATGCCT CCCACTTCTG 801

4 1

GCTGGAGACC TCATCCCACC TCTCAGGGGT GGGGGTGCTC CCCTCCTGGT GCTCCCTCCG 861
GGTCCCCCCT GGTGTAGCA GCTGTGTCT GGGGCCAGGA CCTGAATTCC ACTCCTACCT 921
CTCCATGTTT ACATATTCCC AGTATCTTTG CACAAACCAG GGGTCGGGGA GGGTCTCTGG 981
CTTCATTTTT CTGCTGTGCA GAATATCCTA TTTTATATTT TTACAGCCAG TTTAGGTAAT 1041
AAACTTTATT ATGAAAGTTT TTTTTTAAAA GAAACAAACA AAGATT 1087

請 求 の 範 囲

1. 哺乳類の J A K / S T A T シグナル伝達系における S T A T タンパク質の機能を抑制するタンパク質であって、実質的に純粋であり且つ次の特徴を有するタンパク質。

(1) S T A T 3 又は S T A T 6 により誘導される。

(2) g p 1 3 0 及び S T A T 3 のチロシンリン酸化を阻害する。

(3) S H 2 領域を有する。

2. 該タンパク質が、配列番号 1 の 2 1 2 個のアミノ酸よりなるアミノ酸配列と少なくとも 4 0 % の相同性を有するアミノ酸配列の少なくとも 1 5 0 個の連続したアミノ酸からなる配列を包含することを特徴とする請求項 1 に記載のタンパク質。

3. 該タンパク質が、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する請求項 2 に記載のタンパク質。

4. 請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のタンパク質をコードする D N A 。

5. 該 D N A が配列番号 1 の塩基配列を有する請求項 4 に記載の D N A 。

6. サイトカインレギュレーター作用を有する物質をスクリーニングする方法にして、サンプル材料を請求項1～3のいずれかに記載のタンパク質に接触させ、サンプル試料中に含まれる物質による該タンパク質の活性化又は活性阻害を指標として、サイトカインレギュレーター作用を有する物質を検出することを特徴とするスクリーニング方法。

7. 請求項1～3のいずれかに記載のタンパク質の生合成を抑制するアンチセンスDNA。

8. 請求項1～3のいずれかに記載のタンパク質の生合成を抑制するアンチセンスRNA。

9. 請求項1～3のいずれかに記載のタンパク質に結合するモノクローナル抗体。

10. 請求項4又は5に記載のDNAにハイブリダイズするプローブDNA。

11. 請求項4又は5に記載のDNAにハイブリダイズするプローブRNA。

12. 請求項4又は5に記載のDNAを複製可能なベクター

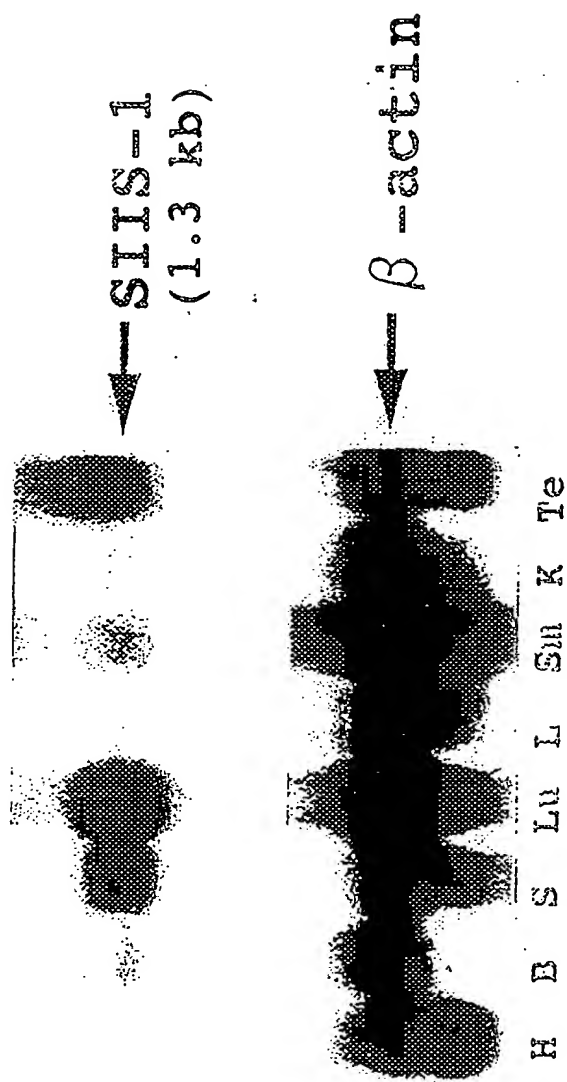
に組み込んでなる複製可能な組換え体DNA。

13. 請求項12に記載の複製可能な組換え体DNAで形質導入された微生物又は細胞。

14. サイトカインレギュレーター作用を有する物質をスクリーニングする方法にして、サンプル材料を請求項13に記載の形質導入された微生物又は細胞に接触させ、サンプル試料中に含まれる物質による、上記形質導入された微生物又は細胞中の該組換え体DNAがコードするタンパク質の活性化又は活性阻害を指標として、サイトカインレギュレーター作用を有する物質を検出することを特徴とするスクリーニング方法。

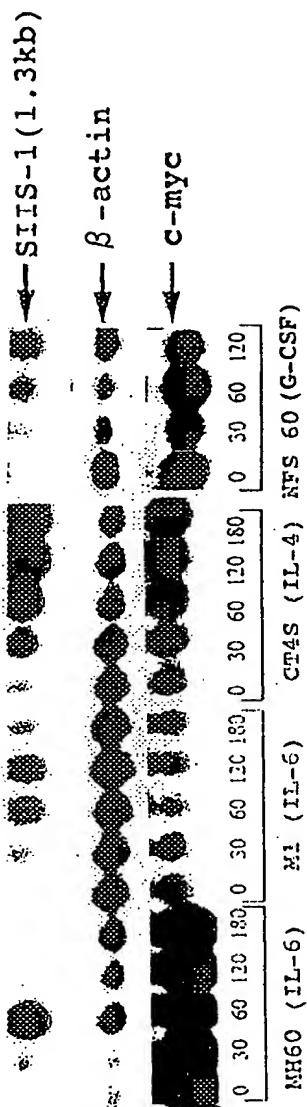
3/9

Fig. 3



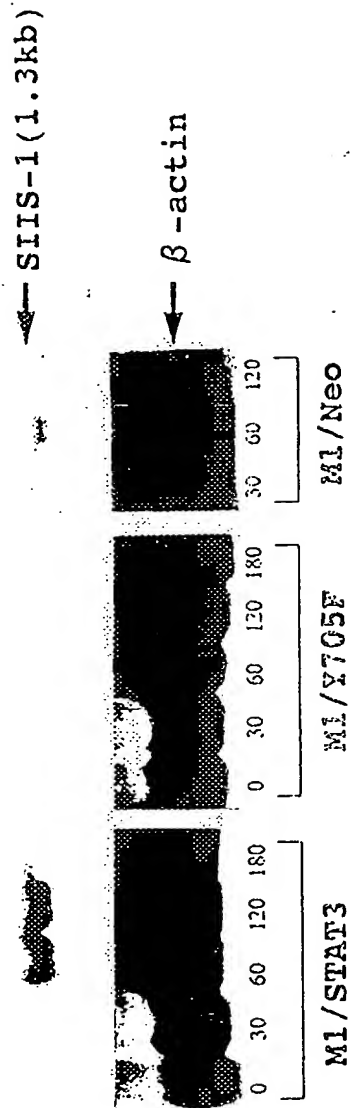
4/9

Fig. 4



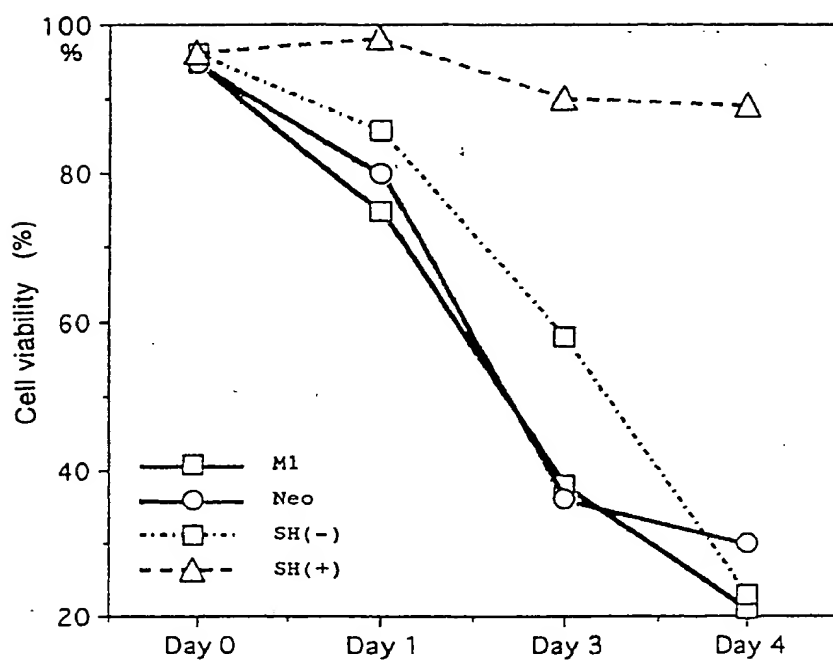
5/9

Fig. 5



6/9

Fig. 6



7/9

Fig. 7

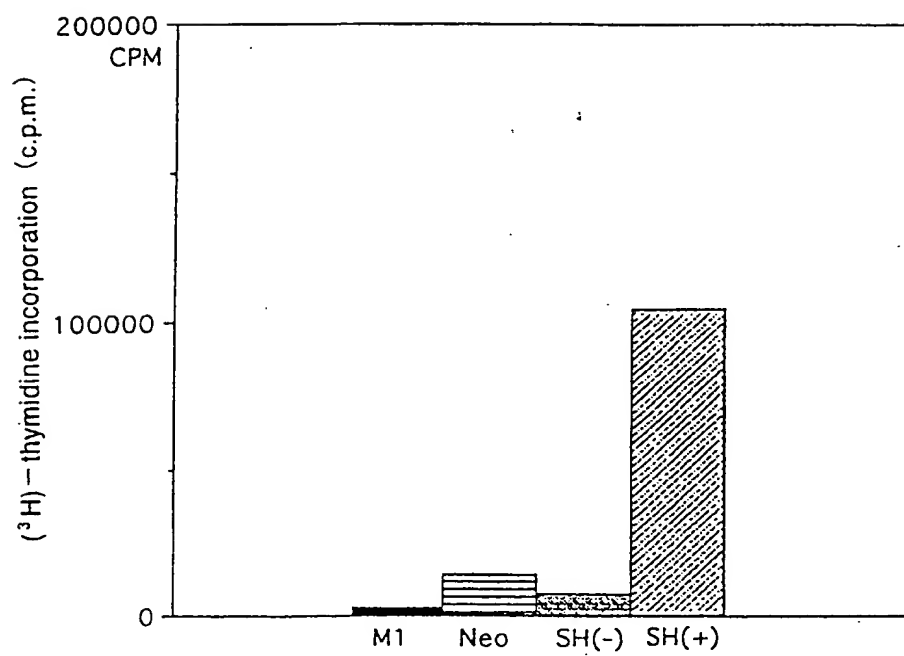


Fig. 8 (a)

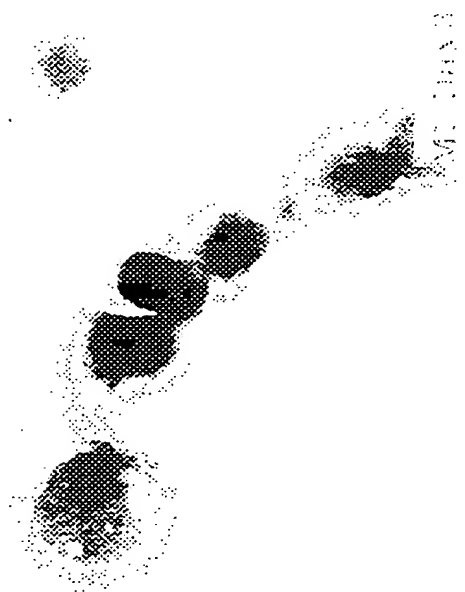


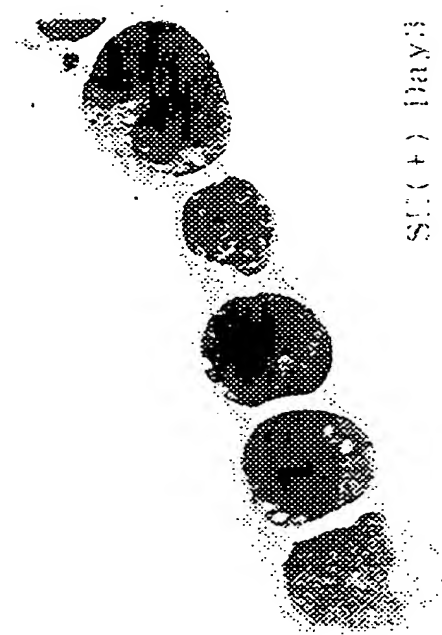
Fig. 8 (b)



Fig. 8 (c)

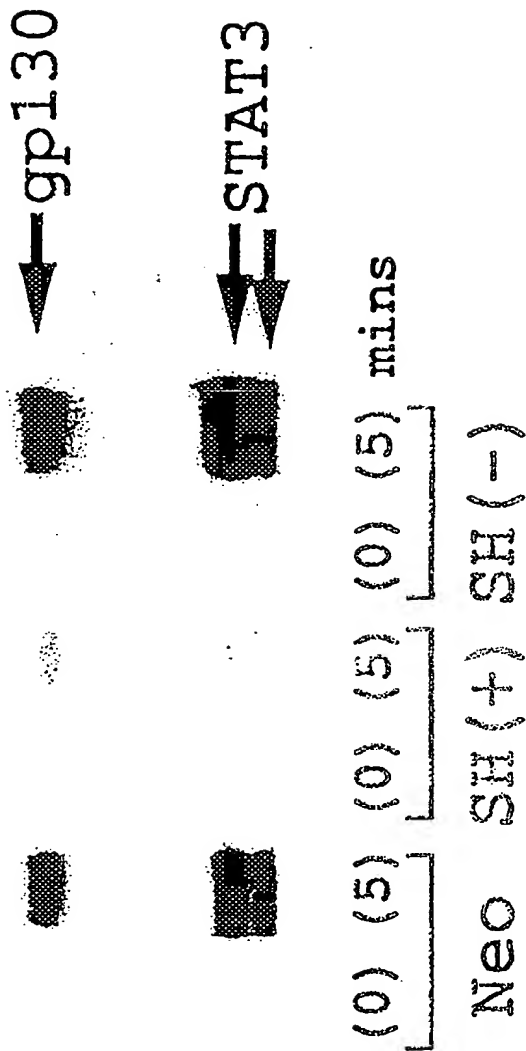


Fig. 8 (d)



9/9

Fig. 9



23) Statement concerning non-perjudicial disclosure or exception to lack of novelty

「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述」

開示の日 1996年10月23日

開示の種類 日本免疫学会総会・学術集会記録第26巻

第26回日本免疫学会総会

Proceedings of the Japanese Society for
Immunology Vol.26

26th General Conference of the Japanese
Society for Immunology

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03860

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12Q1/68, C12Q1/02, C12N5/00, C12N21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12Q1/68, C12Q1/02, C12N5/00, C12N21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank (GENETYX)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-------------------------|
| PX | Takaho, A. et al. "A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases" Nature (1997, Jun.) Vol. 387, p. 921-924 | 1 - 14 |
| PX | Naka, T. et al. "Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor" Nature (1997, Jun.) Vol. 387, p. 924-929 | 1 - 14 |
| PX | Minamoto, S. et al. "Cloning and Functional Analysis of New Members of STAT Induced STAT inhibitor (SSI) Family: SSI-2 and SSI-3" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1997, Aug.) Vol. 237, p. 79-83 | 1 - 14 |
| X A | Gregor, S. et al. "Sequence Analysis of the Conserved Protamine Gene Cluster Shows That it Contains a Fourth Expressed Gene" Mol. Reprod. Dev. (1996) Vol. 43, No. 1, p. 1-6 | 4-5, 7-13 1-3, 6, 14 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 16, 1998 (16. 01. 98)

Date of mailing of the international search report

January 27, 1998 (27. 01. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03860

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | Yoshimura, A. et al. "A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors" ENBO J. (1995) Vol. 14, No. 12, p. 2816-2826 | 1 - 14 |
| PA | Ohya, K. et al. "SOCS-1/JAB/SSI-1 Can Bind to and Suppress Tec Protein-tyrosine Kinase" J. Biol. Chem. (1997, Oct.) Vol. 272, NO. 43, p. 27178-27182 | 1 - 14 |
| PA | Robyn, S. et al. "A Family of Cytokine-inducible inhibitors of signalling" Nature (1997, Jun.) Vol. 387, p. 917-921 | 1 - 14 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12Q1/68, C12Q1/02, C12N5/00,
C12N21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12Q1/68, C12Q1/02, C12N5/00,
C12N21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank (GENETYX)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|-------------------------|
| PX | Takaho, A. et al. "A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases" Nature (1997, Jun.) 第387巻 p. 921-924 | 1-14 |
| PX | Naka, T. et al. "Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor" Nature (1997, Jun.) 第387巻 p. 924-929 | 1-14 |
| PX | Minamoto, S. et al. "Cloning and Functional Analysis of New Members of STAT Induced STAT inhibitor (SSI) Family: SSI-2 and SSI-3" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1997, Aug.) 第237巻 p. 79-83 | 1-14 |
| X A | Gregor, S. et al. "Sequence Analysis of the Conserved Protamine Gene Cluster Shows That it Contains a Fourth Expressed Gene" Mol. Reprod. Dev. (1996) 第43巻 第1号 p. 1-6 | 4-5, 7-13 1-3, 6, 14 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.01.98

国際調査報告の発送日

27.01.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平田 和男

印

4 B 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | Yoshimura, A. et al. "A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors" ENBO J. (1995) 第14巻 第12号 p.2816-2826 | 1-14 |
| PA | Ohya, K. et al. "SOCS-1/JAB/SSI-1 Can Bind to and Suppress Tec Protein-tyrosine Kinase" J. Biol. Chem. (1997, Oct.) 第272巻 第43号 p. 27178-27182 | 1-14 |
| PA | Robyn, S. et al. "A Family of Cytokine-inducible inhibitors of signalling" Nature (1997, Jun.) 第387巻 p. 917-921 | 1-14 |